

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

J1000 U.S. PTO  
09/897438  
07/03/01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 7月 4日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-202801

出 願 人

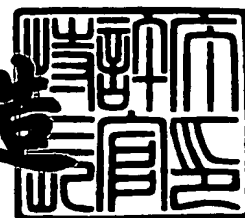
Applicant(s):

理化学研究所

2001年 5月11日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3040533

【書類名】 特許願

【整理番号】 RJH12-008N

【提出日】 平成12年 7月 4日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07K 14/00

【発明の名称】 リーリントンパク質C R - 5 0 エピトープ領域

【請求項の数】 11

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都三鷹市井の頭 2 - 1 9 - 2 5

    【氏名】 御子柴 克彦

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都練馬区関町南 2 - 2 5 - 3 6

    【氏名】 楯 直子

【特許出願人】

    【識別番号】 000006792

    【氏名又は名称】 理化学研究所

【代理人】

    【識別番号】 100091096

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

    【識別番号】 100096183

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 石井 貞次

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 015244

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9503608

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 リーリントタンパク質CR-50エピトープ領域

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 リーリントタンパク質のCR-50抗体認識部位を含み、F-spondin ドメイン及びリピート部位を含まないリーリントタンパク質CR-50エピトープ領域ポリペプチド。

【請求項 2】 マウスに由来する請求項 1 に記載のリーリントタンパク質CR-50エピトープ領域ポリペプチド。

【請求項 3】 以下の (a) または (b) のいずれかであるポリペプチド。

(a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつCR-50抗体と結合し得るポリペプチド

【請求項 4】 請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 5】 以下の (a) から (c) のいずれかであるポリヌクレオチド。

(a) 配列番号 1 に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド

(b) 配列番号 1 に示すヌクレオチド配列において、1 個または数個のヌクレオチドが欠失、置換若しくは付加されたヌクレオチド配列からなり、かつCR-50抗体と結合し得るポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

(c) (a) または (b) のポリヌクレオチドの配列と縮重関係にあるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド

【請求項 6】 請求項 4 または 5 に記載のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター。

【請求項 7】 請求項 6 に記載の発現ベクターでトランスフェクトされた宿主細胞。

【請求項 8】 請求項 7 に記載の宿主細胞を培養することを含む、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項 9】 請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、または請求項 4 若しくは 5 に記載のポリヌクレオチドを添加することを含む、リーリントンパク質の会合体形成を促進する方法。

【請求項 10】 請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、または請求項 4 若しくは 5 に記載のポリヌクレオチドを含む、リーリントンパク質の会合体形成を促進する組成物。

【請求項 11】 請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、または請求項 4 若しくは 5 に記載のポリヌクレオチドを含む、神経細胞の配置異常による疾患の診断及び／または治療のための医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、リーリントンパク質のCR-50エピトープ領域ポリペプチド及びそれをコードするポリヌクレオチドに関する。

【0002】

【従来の技術】

哺乳動物の中樞神経系（CNS）においては、種々のクラスのニューロンがその発生部位から最終的な場所に移動して、精巧な層構造に配置されることが知られている（Rakic, P., (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 11323-11327; Pearlman, A. L.ら, (1998) Curr. Opin. Neurobiol., 8, 45-54; Rice, D. S. & Curran, T., (1999) Genes Dev., 13, 2758-2773）。新皮質の発達は、プレプレート形成から開始する。プレプレートは、皮質表面近くに存在し、皮質求心性神経線維及びCajal-Retzius及び将来のサブプレートニューロンを含む最も早期に生成したニューロンの表面叢から構成される。従って、プレプレートは皮質プレートニューロンによって分割され、Cajal-Retziusニューロンが分化する表面の辺縁層、及びサブプレートニューロンが分化する深部のサブプレートになる（Allendoerfer, K. L. & Shatz, C. J. (1994) Annu. Rev. Neurosci., 17, 185-218）。皮質プレートニューロンは脳室帯で発生し、放射状のグリア線維に沿って中間帯及びサブプレートを通過して移動し、皮質プレートに到達する。より早

い時期に発生したニューロンを乗り越えて、より遅い時期に発生したニューロンが規則的に移動することにより、哺乳類の皮質層にインサイドアウトのニューロンの層形成がなされる (Angevine, J. B. & Sidman, R. L. (1961) *Nature*, 25, 766-768; Rakic, P. (1972) *J. Comp. Neurol.*, 145, 61-84)。

### 【 0 0 0 3 】

マウスの常染色体劣性突然変異体であることが知られているリーラーは、ニューロンが正常に発生するが配置が異常なものであり、その結果CNSに秩序立った皮質層が形成されない (Falconer, D. S., (1951) *J. Genet.*, 50, 192-201; Rakic, P. & Caviness, V. S. J., (1995) *Neuron*, 14, 1101-1104; Stanfield, B. B. & Cowan, W. M. (1979) *J. Comp. Neurol.* 185, 423-459; Caviness, V.S. Jr. (1982) *Dev. Brain Res.*, 4, 293-302; Caviness, V. S. Jr. & Sidman, R. L., (1973) *J. Comp. Neurol.*, 148, 141-151; deRouvroit, C. L. & Goffinet, A. M. (1998) *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.*, 150, 1-106)。例えばリーラーの新皮質においては皮質プレートニューロンが正常マウスとは逆の向きに配列している（「アウトサイド-イン」）。本発明者等は先に、リーラーマウスを正常な胎児脳ホモジネートで免疫することによって、モノクローナル同種抗体、CR-50を得た (Ogawa, M.ら, (1995) *Neuron*, 14, 899-912)。この抗体は、正常マウスの辺縁帯におけるCajal-Retziusニューロンと特異的に反応することが示された。その後、CR-50抗体は、リーラー遺伝子 (reelin, Reln) によってコードされるリーリントタンパク質そのものを認識することが示された。リーリンは、3461アミノ酸から構成される、相対分子量388Kの分泌型細胞外マトリクスタンパク質である (D'Arcangelo, G.ら, (1997) *J. Neurosci.* 17, 23-31; D'Arcangelo, G.ら, (1995) *Nature*, 374, 719-723) (図1A)。リーリンのN-末端は脊髄における交連軸索の接着及び伸長を調節する細胞外マトリクスタンパク質であるF-spondinのN-末端と25%の同一性を有する (Klar, A.ら, (1992) *Cell* 69, 95-110)。リーリンの最初の500アミノ酸に続いて、それぞれ350-390アミノ酸からなり、中央に30アミノ酸のEGF様モチーフを含む8個の「リーリンリピート」がある (D'Arcangelo, G.ら, (1995) *Nature*, 374, 719-723)。リーリンの高度に荷電したC-末端は、細胞外空間への分泌に必須である (D'Arcangelo, G.ら,

(1997) *J. Neurosci.* 17, 23-31; deBeyck, V.ら, (1997) *Mol. Brain Res.*, 50, 85-90)。

【 0 0 0 4 】

細胞質においては、リーリングナルは細胞質内アダプタータンパク質、Disabledホモログ1 (Dab1) によって受け取られる (Howell, B. W.ら, (1997) *EMBO J.* 16, 121-132; Howell, B. W.ら, (1997) *Nature* 389, 733-737; Howell, B. W.ら, (1999) *Genes Dev.* 13, 643-648; Sheldon, M.ら, (1997) *Nature*, 389, 730-733; Ware, M. L.ら, (1997) *Neuron*, 19, 239-249; Rice, D. S.ら, (1998) *Development*, 125, 3719-3729)。このタンパク質の欠損は、マウスにおいてリーラー様表現型を引き起こす (Howell, B. W.ら, (1997) *Nature* 389, 733-737; Sweet, H. O.ら, (1996) *Mamm. Genome*, 7, 798-802, *J. Biol. Chem.*, 273, 556-560; Yoneshima, H.ら, (1997) *Neurosci. Res.*, 29, 217-223)。Dab1は、数種の細胞表面タンパク質の細胞質ドメインにおける非リン酸化NPxYモチーフに結合する (Pawson, T. & Scott, J. D. (1997) *Science*, 278, 2075-2080; Trommsdorff, M.ら, (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 3556-3560; Homayouni, R.ら, (1999) *J. Neurosci.*, 19, 7507-7515; Howell, B.ら, (1999) *Mol. Cell. Biol.*, 19, 5179-5188)。リーリンはDab1のチロシンリン酸化を誘導する (Howell, B. W.ら, (1999) *Genes Dev.* 13, 643-648)。超低密度リポタンパク質受容体 (VLDLR) 遺伝子及びアポリポタンパク質E受容体2 (ApoER2) 遺伝子を共に欠いたダブルノックアウトマウスの表現型がリーラーマウスの表現型と区別できないことも示された (Trommsdorff, M.ら, (1999) *Cell*, 97, 698-701)。近年、リーリンはVLDLR、ApoER2 (D'Arcangelo, G.ら, (1999) *Neuron*, 24, 471-479; Hiesberger, T.ら, (1999) *Neuron*, 24, 481-489)、及びカドヘリン関連ニューロン受容体 (CNR) ファミリーメンバー (Senzaki, K.ら, (1999) *Cell* 99, 635-647) に結合し、これはDab1のチロシンリン酸化につながることで報告された。これらの結果から、リーリンは、VLDLR、ApoER2、及びCNRファミリータンパク質を介してDab1のチロシンリン酸化を刺激することによって、ニューロンの移動及び配置を調節することが示唆される。

【 0 0 0 5 】

## 【発明が解決しようとする課題】

上記CR-50抗体は、リーリンの機能をin vitro及びin vivoの双方で中和する活性を有している (Ogawa, M.ら, (1995) Neuron, 14, 899-912; DelRio, J. Q.ら, (1997) Nature, 385, 70-74; Miyata, T.ら, (1997) J. Neurosci., 17, 3599-3609; Nakajima, K.ら, (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 8196-8201)。最近、本発明者等はCR-50抗体の認識するエピトープがN-末端近辺に位置していることを報告した (D'Arcangelo, G.ら, (1997) J. Neurosci. 17, 23-31)。CR-50抗体はリーリンの機能を阻害することから、このCR-50エピトープ領域は神経発達の過程におけるリーリンシグナル伝達において重要な役割を果たしていると考えられる。そこで、脊椎動物におけるリーリントタンパク質自体の機能を更に研究し、リーリン遺伝子の異常並びにニューロンの配置異常に起因する脳の障害に対して適切な診断及び治療を提供することを可能とするために、リーリンのCR-50エピトープ領域を特定し、リーリントタンパク質におけるその機能を検討することが必要である。

## 【0006】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者等は、リーリントタンパク質がin vitro及びin vivoの双方で互いに結合して大きなタンパク質複合体を形成することを見出した。興味深いことに、この会合体形成は、リーリン機能を中和することが知られている濃度のCR-50抗体によって明らかに阻害された。

## 【0007】

本発明者等は先に、F-spondinドメイン及びCR-50認識部位を含み、リピート部位を含まないXenopusにおけるトランケート型リーリントタンパク質を見出した (特願2000-109954号) が、上記知見に基づき更に検討した結果、CR-50との結合、及び本発明によって初めて見出されたこのリーリントタンパク質の複合体形成に最も重要であるエピトープ領域ポリペプチドを単離し、その有用性を初めて見出した。

## 【0008】

すなわち本発明者等は、CR-50エピトープ領域が、リーリントタンパク質のアミ



ノ酸230-346に相当することを見出した（配列番号2）。そしてこのエピトープ領域をコードするポリヌクレオチド（配列番号1）を発現ベクターに導入し、大腸菌で発現させて得られる組み換えCR-50エピトープ領域を用いて検討したところ、このエピトープ領域ポリペプチドが静電的相互作用によって速やかに規則的なホモポリマーを形成することを見出し、このポリマーの形成が全長のリーリントタンパク質の会合体形成及び機能と密接に関係することを見出し、本発明に到った。

【0009】

すなわち、本発明は、以下の（1）～（11）を提供する。

（1） リーリントタンパク質のCR-50抗体認識部位を含み、F-spondinドメイン及びリピート部位を含まないリーリントタンパク質CR-50エピトープ領域ポリペプチド。

【0010】

本明細書において、「リーリントタンパク質」とは、リーラー突然変異マウスの原因遺伝子にコードされるタンパク質で、シグナルペプチド、F-spondinドメイン、CR-50認識部位、リーリンリピートを含む細胞外基質タンパク質をいう。

「F-spondinドメイン」とは、リーリントタンパク質のN末端側において、F-spondinとの間に相同性が認められる領域をいう。

【0011】

「CR-50認識部位」とは、マウスのリーリントタンパク質において、CR-50抗体の認識する部位、または他の生物のもつリーリントタンパク質においては、マウスリーリンのCR-50認識部位と相同な領域をいう。なお、CR-50抗体は、Neuron 14, 899-912(1995)に記載の方法により作製することができる。

「リピート部位」とは、リーリントタンパク質において、中心にEGF様モチーフをもつ互いに相同性のあるアミノ酸配列の単位が連続して繰り返される領域をいう。

【0012】

（2） マウスに由来する上記（1）に記載のリーリントタンパク質CR-50エピトープ領域ポリペプチド。

(3) 以下の (a) または (b) のいずれかであるポリペプチド。

(a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ CR-50 抗体と結合し得るポリペプチド

(4) 上記 (1) から (3) のいずれかに記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【0013】

(5) 以下の (a) から (c) のいずれかであるポリヌクレオチド。

(a) 配列番号 1 に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド

(b) 配列番号 1 に示すヌクレオチド配列において、1 個または数個のヌクレオチドが欠失、置換若しくは付加されたヌクレオチド配列からなり、かつ CR-50 抗体と結合し得るポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

(c) (a) または (b) のポリヌクレオチドの配列と縮重関係にあるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド

上記 (3) または (5) における「数個」とは、例えば部位特異的突然変異誘導法等によって誘導し得る変異の数をいい、突然変異前の機能を損なわない範囲の数を意味する。

また、「縮重関係」とは、ヌクレオチド配列は相違しているが、コドンの縮重のために互いに同じアミノ酸またはアミノ酸配列をコードする 2 以上のポリヌクレオチド間の関係を意味する。

【0014】

(6) 上記 (4) 若しくは (5) に記載のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター。

上記ポリヌクレオチドを含有し得るベクターとしては、当分野において使用可能なことが知られ、上記ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドの発現に好適なものであれば特に限定されるものではないが、例えば pET-29a (Novagen)、pcDNA3 (Invitrogen) 等が挙げられる。

【0015】

また、当分野において公知のように、発現ベクター中に上記ポリヌクレオチドの発現を制御し得るプロモーター、エンハンサー等の調節配列を適宜含ませることが出来る。

更に、発現させるポリペプチドは本発明に係るポリペプチドのみであっても良いが、目的に応じ、例えばグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 等の他のタンパク質、またはヒスチジンタグ等のタグ等との融合タンパク質として発現させても良い。

【0016】

(7) 上記(6)に記載の発現ベクターでトランスフェクトされた宿主細胞。

宿主細胞としては、上記ポリペプチドを発現できるものであればいずれでも良く、当分野において使用可能なことが知られている動物細胞、植物細胞、細菌等が挙げられるが、特に大腸菌、293T細胞、COS細胞等を使用するのが好適である。

【0017】

(8) 上記(7)に記載の宿主細胞を培養することを含む、上記(1)から

(3)のいずれかに記載のポリペプチドの製造方法。

(9) 上記(1)から(3)のいずれかに記載のポリペプチド、または上記

(4)若しくは(5)に記載のポリヌクレオチドを添加することを含む、リーリンタンパク質の会合体形成を促進する方法。

【0018】

(10) 上記(1)から(3)のいずれかに記載のポリペプチド、または上記

(4)若しくは(5)に記載のポリヌクレオチドを含む、リーリンタンパク質の会合体形成を促進する組成物。

(11) 上記(1)から(3)のいずれかに記載のポリペプチド、または上記

(4)若しくは(5)に記載のポリヌクレオチドを含む、神経細胞の配置異常による疾患の診断及び／または治療のための医薬組成物。

【0019】

【発明の実施の形態】

胎児脳の生細胞を抗リーリン抗体で染色した場合、新皮質のCajal-Retzius二

ニューロン等のリーリン分泌細胞の細胞表面が斑点状のパターンで標識される (Ogawa, M.ら, (1995) *Neuron*, 14, 899-912; deBeybeck, V.ら, (1997) *Mol. Brain Res.*, 50, 85-90; Miyata, T.ら, (1997) *J. Neurosci.*, 17, 3599-3609; Nakajima, K.ら, (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 8196-8201) ことから、リーリントランスポーターが集まってリーリン分泌細胞の細胞膜表面に結合していることが示唆される。リーリントランスポーターが *in vivo* で実際に集まっているか否かを決定するために、非変性及び変性ゲル電気泳動後のウェスタンブロット分析を行った。胎児の脳ホモジネート (胎児期18日; E18) を変性条件下で分離した場合、抗リーリン抗体による免疫ブロットから、ヘテロ接合体リーラー (Rln r1/+; r1/+) で400kDaのバンドのみが明らかになった (図1B)。これは明らかにリーリントランスポーターのモノマーに対応している。対照的に、脳 (E18) 及び小脳 (生後5日; P5) ホモジネートを非変性ネイティブゲル上で分離した場合、ヘテロ接合体 (r1/+) のモノマーバンドに加え、400kDaからウェルまで広がった広範囲のバンドが検出された (図1C)。

#### 【 0 0 2 0 】

次いで培養した小脳顆粒細胞から分泌されたリーリンの状態を調べた。リーラーホモ接合体 (r1/r1) 及びヘテロ接合体の初代小脳培養の上清を非変性ネイティブゲル電気泳動上で分離し、抗リーリン抗体で検出した。この実験においても、ヘテロ接合体マウスのサンプルのみが分子量400kDa以上の広範囲のバンドを示した (図1D)。これらの結果から、分泌されたリーリンは、*in vitro* 及び *in vivo* 双方で大きなタンパク質複合体の状態にあることが示唆された。

#### 【 0 0 2 1 】

次いで、リーリントランスポーター分子が互いに相互作用を実際に示すか否かを細胞接着アッセイにより検討した。分泌されたリーリンの一部はリーリン産生脳細胞そのものの表面に結合している (Ogawa, M.ら, (1995) *Neuron*, 14, 899-912; deBeybeck, V.ら, (1997) *Mol. Brain Res.*, 50, 85-90; Miyata, T.ら, (1997) *J. Neurosci.*, 17, 3599-3609; Nakajima, K.ら, (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 8196-8201) ことから、分泌されたリーリンが293T細胞に同様に結合するか否かを調べるために、リーリントランスポーター293T生細胞をCR-50抗

体で染色した（図 2 A）。生きた 293T 細胞の細胞表面は、生きた脳細胞の表面と同様な斑点状のパターンで染色されたが、固定された細胞は細胞質が拡散して染色された（図 2 B）。これらの結果から、分泌されたリーリン分子の一部がトランスフェクトされた 293T 細胞の表面に結合していることが示される。

#### 【 0 0 2 2 】

リーリントランスフェクト 293T 細胞をリーリン被覆皿上に接種した場合、リーリンを含有しない上清で被覆した対照の皿（図 2 D, G）よりずっと多くの細胞が結合した（図 2 C）。骨格のベクターのみをトランスフェクトした対照細胞はリーリン被覆または対照の皿に結合しなかった（図 2 E-G）。従って、リーリン分子が互いに相互作用することが示唆された。実際、リーリンの断片を有する発現 cDNA ライブラリーを、これと相互作用する分子を探すためにスクリーニングすると、リーリン cDNA の集団そのものが第 2 及び第 3 のスクリーニングによって顕著に富化された（データは示さない）。これらのことから、リーリタンパク質が互いに結合して大きなタンパク質複合体を形成することが明らかになった。

#### 【 0 0 2 3 】

次いで、このリーリン分子間の相互作用とリーリタンパク質の機能との関係を更に検討するために、CR-50 抗体がリーリン分子の会合体形成に及ぼす効果を検討した（図 3）。その結果、CR-50 抗体の添加によってリーリン分子の会合体形成が阻害され、この会合体形成がリーリタンパク質の機能と結びついたものであり、しかもエピトープ領域によるものであることが明らかになった。このことを更に確認するために、本発明者等は CR-50 抗体の認識部位であるエピトープ領域のみを発現させた。

#### 【 0 0 2 4 】

リーリタンパク質のエピトープ領域の特定は、以下のように行った。まず、リーリン分子の遺伝子配列の一部分を部分的にコードする遺伝子配列を組み込んだ遺伝子発現系を系統的に多数作製し、*in vitro* 転写／翻訳実験（プロメガのプロトコールに従う）により、各々の遺伝子がコードするタンパク質を産生させた。この各々のタンパク質について、CR-50 抗体により、免疫沈降するか否かをウエスタンブロット法で解析し、CR-50 抗体が認識するエピトープ領域を決定

した。

【 0 0 2 5 】

この結果、リーリントタンパク質のCR-50エピトープ領域はアミノ酸230-346（配列番号2）であることが明らかになった。

リーリントタンパク質の会合体がCR-50エピトープ領域そのものによって仲介されているのか否かを決定するために、ペトリ皿を精製した組み換えCR-50エピトープ断片で被覆し、全長リーリンでトランスフェクトした293T細胞を用いて細胞接着アッセイを実施した。リーリン提示細胞をCR-50エピトープ被覆皿上に接種した場合、対照の皿と比較して用量依存的にずっと多くの細胞が結合した（図4）。これらの結果から、リーリントタンパク質が精製CR-50エピトープ断片に結合することが示され、リーリン分子の相互作用がCR-50エピトープ領域そのものによって仲介されていることが示唆された。

【 0 0 2 6 】

上記の知見から、例えばサンプルにおけるリーリントタンパク質の会合体形成の有無及び／または程度を検出することによって、そのサンプルにおけるリーリントタンパク質の異常を検出することが可能であることが明らかである。検出方法としては、特に限定するものではないが、例えばサンプルからリーリントタンパク質またはこれをコードする遺伝子を抽出し、必要に応じて精製、増幅等の操作を行った後、電気泳動、ゲル濾過クロマトグラフィー、細胞接着アッセイ、電子顕微鏡観察からなる群から選択される1または複数の使用を含む方法が挙げられる。

【 0 0 2 7 】

また、CR-50エピトープ領域を被覆したプレートを調製し、サンプルにおけるリーリントタンパク質を含むエピトープ結合性物質をスクリーニングするために使用することができる。CR-50エピトープ領域の代わりにCR-50抗体を被覆したプレートを使用した場合には、エピトープ領域を含むリーリントタンパク質をより特異的にスクリーニングすることができる。これらのスクリーニング方法においては、当業者であれば容易に認識されるように、蛍光色素を結合させた2次抗体の使用等によって結合の有無を検出することができる。

【 0 0 2 8 】

更に、CR-50抗体を被覆したプレートを含む、サンプル中のリーリントタンパク質またはそのエピトープ領域を含む断片の有無または量を検出するためのキットを提供することができる。

また、本発明のポリペプチドまたはこれをコードするポリヌクレオチドを添加することによって、生体におけるリーリントタンパク質の会合体形成を促進することが可能である。この場合、本発明のポリペプチドまたはこれをコードするポリヌクレオチドは単独で添加しても良いが、リーリントタンパク質の会合体形成を促進する組成物として添加することも可能である。組成物に含めることができる他の成分については特に限定されるものではなく、当分野で通常使用されるものであり、本発明の目的を達成可能なものであればいずれでも良い。

#### 【 0 0 2 9 】

生体においては、リーリントタンパク質が正常に機能するために会合体を形成していることが必要であることが見出されたが、リーリントタンパク質の機能解明のためにその会合体形成を阻害する方法も提供される。リーリントタンパク質の会合体形成を阻害する組成物としては、例えばリーリントタンパク質のCR-50エピトープ領域ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含むもの等が挙げられる。

#### 【 0 0 3 0 】

また、本発明により、本発明のポリペプチド、またはこれをコードするポリヌクレオチドを含む、神経細胞の配置異常による疾患の治療のための医薬組成物を提供することができる。例えば、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現ベクターに組み込み、これを患者の組織に由来する神経芽細胞、神経幹細胞等に導入し、この細胞を患者の脳に移植することにより、神経細胞の配置異常による疾患、例えば滑脳症、多小脳回症、異所性灰白質等の疾患の治療を行うことができる。医薬組成物は、本発明のポリペプチド、またはこれをコードするポリヌクレオチドの他、医薬組成物に通常用いられる製薬上許容し得る担体、賦形剤、緩衝剤等を含むことができる。

#### 【 0 0 3 1 】

#### 【実施例】

以下本発明を実施例を挙げて説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

#### 動物

ヘテロ接合体B6C3Fe-a/a-rlの成体 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) 由来のリーラーマウスを使用した。ホモ接合体及びヘテロ接合体のマウスは、ホモ接合体の雄とヘテロ接合体の雌の交配によって得た。膣栓が検出された日、及び出生日をそれぞれE0及びP0とした。

【 0 0 3 2 】

#### 小脳初代培養

リーラーマウス (P5) の小脳から単一細胞懸濁液を調製した。10%FCSを添加した基本イーグル培地中の細胞懸濁液を、 $5 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  のポリ-L-リシン被覆プラスチック皿上にまいた。皿にまいてから18時間後に培養を無血清培地に移し、4日間インキュベートし、培養上清を回収した。会合体形成に対する効果を調べる場合、無血清培地には最初からCR-50抗体を添加した。

【 0 0 3 3 】

#### 電気泳動及びウェスタンブロット分析

リーリンのSDS-PAGE及びネイティブゲル電気泳動を実施した。電気泳動の後、タンパク質をフィルター (Millipore) 上に移した。ブロッキング後、フィルターを一次抗体 (G10: 抗リーリンモノクローナル抗体; J. Neuroscience Methods, 82, 17-24, 1998) 溶液と共に室温で3時間インキュベートした。インキュベーションの後、フィルターを洗浄してペルオキシダーゼ結合抗マウス二次抗体 (Jackson ImmunoResearch) 溶液と共にインキュベートした。1時間のインキュベーションの後、フィルターを洗浄し、化学発光検出システム (Boehringer-Mannheim) によってシグナルを可視化した。ホモジネートタンパク質100  $\mu\text{g}$  または小脳培養上清20  $\mu\text{g}$  を使用した。

【 0 0 3 4 】

#### 免疫組織染色

293T細胞を全長マウスリーリン発現構築物 (pCrl; D'Arcangeloら、J. Neuroscience, January 1, 17(1):23-31, 1997, (T.Curranから頂く)) でトランスフェ



クトした。トランスフェクションの2日後、細胞を4 %PFAで固定し、0.05% TritonX-100で処理し、10%ウマ血清でブロックした。免疫染色は5 mg/mlのストックから1:200希釈した精製CR-50抗体で実施した。二次抗体は1:100希釈のフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 結合抗マウスIgGを用いた。生細胞表面染色の場合、CR-50を1:200希釈で培養細胞の培地に直接添加し、37℃で30分間インキュベートした。次いで細胞を固定し、ブロックし、二次抗体と共にインキュベートした。

【0035】

#### [実施例1]

##### リーリンCR-50エピトープ領域の決定

PCR法により、リーリタンパク質の全アミノ酸配列のうち、次の各部分に相当するポリヌクレオチドを作製した。1-1800 (プライマー: ATGGAGCGCGGCTGCTGGGC (配列番号3) 及び AGGAACAACAGGAACACAG (配列番号4))、1-460 (プライマー: ATGGAGCGCGGCTGCTGGGC (配列番号3) 及び CCTCTCTCCATCTTTGAGGAAC (配列番号5))、1-346 (プライマー: ATGGAGCGCGGCTGCTGGGC (配列番号3) 及び CAGGGCCCAGCAGGCCTCATAC (配列番号6))、1-230 (プライマー: ATGGAGCGCGGCTGCTGGGC (配列番号3) 及び CTCTCCCATCTCACAGTTGCTG (配列番号7))、1-190 (プライマー: ATGGAGCGCGGCTGCTGGGC (配列番号3) 及び GTAAGCAGTGGCCTCTGTGGG (配列番号8))、190-346 (プライマー: TACTCGCACCTTGCTGAAATAC (配列番号9) 及び CAGGGCCCAGCAGGCCCTCATAC (配列番号6))、及び230-346 (プライマー: GAGCAGTGTGGCACCATCATG (配列番号10) 及び CAGGGCCCAGCAGGCCCTCATAC (配列番号6))。これらをpcDNA3ベクター (Invitrogen; サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、T7プロモーターを有する) にライゲースを用いて組み込み、遺伝子発現系を構築した。次にそれらがコードするDNAを精製し、そのうち2  $\mu$ gをT7 RNAポリメラーゼと反応させてRNAを合成し、このRNAから、reticulocyte lysate transcription/translation system (TnT, Promega) により各タンパク質を合成した。この各タンパク質について、以下の方法により免疫沈降実験を行った。まず各タンパク質溶液50  $\mu$ lをRIPAバッファー (50mM Tris, pH8.0, 150mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% Na デオキシコレート, 0.1% SDS) によって1 mlに希釈した。この際、プロ

テアーゼ阻害剤のロイペプチン ( $20 \mu\text{g/ml}$ )、アプロチニン ( $0.1\text{mg/ml}$ )、フェニルメチルスルフォニルフルオライド ( $2 \text{ mM}$ ) を加えておく。この各タンパク質溶液にCR-50抗体を含む腹水  $50 \mu\text{l}$  を加え、 $4^\circ\text{C}$ 、一昼夜、インキュベートした。その後、Immobilized G-proteinアガロースビーズ (Immunopure plus, Pierce) を加え、 $4^\circ\text{C}$  で30分間インキュベートし、生成した免疫沈降物は遠心して回収し、RIPAバッファーで3回洗浄した。これを  $20 \mu\text{l}$  SDS-sample バッファーで再懸濁させ、電気泳動した。CR-50エピトープを含むタンパク質は免疫沈降することから、この一連の結果からCR-50エピトープ部位 (230-346、配列番号2) を決定した。

## 【0036】

## [実施例2]

リーリンエピトープタンパク質の発現及び精製

CR-50抗体に対するリーリンエピトープ断片 (残基230-346、配列番号2) をHis-Tag融合タンパク質として大腸菌で発現させた。

リーリンのCR-50エピトープ領域をコードするポリヌクレオチド (配列番号1) のPCR増幅 (プライマーGAGCAGTGTGGCACCATC (配列番号11) 及びCAGGGCCCAGCAGGCCTCATAC (配列番号6)) によってこれをpET-29a (Novagen) 中にクローニングした。CR-50エピトープ領域をコードするこのインサートをT4 DNAリガーゼによってC末端His-Tag配列 (Novagen) を含むpET-29aベクター中にライゲートし、BL21/pLysS大腸菌細胞 (Novagen) に形質転換した。インサートの配列はDNA配列決定 (ABI PRISM Model 3700) によって確認した。IPTGによって組み換えリーリンエピトープポリペプチドの発現を誘導し、His結合樹脂アフィニティーカラムを用いたpETシステムプロトコールに基づく手順で大腸菌抽出物からCR-50エピトープタンパク質を精製した。具体的には大腸菌を集菌し、 $5 \text{ mM}$  イミダゾール、 $20 \text{ mM}$  Tris-HCl ( $\text{pH}8.0$ )、 $0.5 \text{ M}$  NaCl及び $0.2 \text{ mM}$  PMSFを含有するバッファーに再度懸濁し、超音波処理した。遠心分離後、上清をHis結合樹脂アフィニティーカラム (Novagen) 上にのせた。

## 【0037】

## [実施例3]

細胞接着アッセイ

リーリンの会合体形成がその生理的機能に関連しているか否かを調べるために、リーリン分子間の相互作用に対する機能阻止抗リーリン抗体、CR-50 (Ogawa, M.ら, (1995) *Neuron*, 14, 899-912; DelRio, J. Q.ら, (1997) *Nature*, 385, 70-74; Miyata, T.ら, (1997) *J. Neurosci.*, 17, 3599-3609) の効果を調べた。

## 【0038】

全長リーリンオープンリーディングフレームを含むpCr1でトランスフェクトした293T細胞、及びベクターpcDNA3 (Invitrogen) 単独でトランスフェクトした同細胞を、DMEM+10%ウシ胎児血清 (FCS) 中で5日間培養し、上清を回収した。前者の上清は全長リーリン分子を含み、後者はリーリンを含まない。ニトロセルロース/メタノール処理後、一晚のインキュベーションによって各上清でペトリ皿を被覆した。CR-50エピトープ被覆皿の調製は、大腸菌によって産生されたCR-50エピトープタンパク質と共に一晚インキュベーションしてペトリ皿を被覆した。次いで、pCr1またはpcDNA3でトランスフェクトした293T細胞を48時間培養し、回収した後に、リーリンで予め被覆した皿、またはpcDNA3トランスフェクト293T細胞の培養上清で予め被覆した対照皿上にそれぞれまいた。2時間のインキュベーションの後、浮遊細胞がなくなるまで各プレートをパンニングバッファー (10% v/v FCSを含有するPBS) で7-10回洗浄した。細胞接着に対するCR-50抗体の効果を調べる場合は、インキュベーション開始時からこれらを培地に添加した。次いで先に被覆した皿上に残存した細胞をコンピューター制御カメラに連結した顕微鏡によって観察した。この実験は5回繰り返し、また、各皿については5つの顕微鏡の視野について計数した。

## 【0039】

細胞接着アッセイにおいて、CR-50抗体を培地に添加した場合、用量依存的に接着が阻害された (図3A-E)。CR-50抗体20、50または200  $\mu\text{g/ml}$  において、結合した細胞数は、それぞれ対照の56%、44%及び32%に減少した (図3A)。細胞接着アッセイが非特異的バックグラウンド結合の約20%を示すことを考慮すると (図2D-G)、20、50及び200  $\mu\text{g/ml}$  のCR-50抗体は、それぞれおよそ1/3、1/4及び1/10まで特異的結合を阻害できる。細胞接着アッセイは、技術的に困難なため

、一般に高いバックグラウンド値を有することから、培地中に分泌されるリーリンの会合体形成に対するCR-50抗体の効果を更に検討した。この抗体と共に小脳顆粒細胞を培養し、その上清をウエスタンブロットによって分析した。興味深いことに、CR-50抗体20  $\mu$ g/mlにおいても、ブロードな高分子量バンドは全く検出されなかった（図3F）。培地に免疫していないマウスの免疫グロブリンG（IgG）を添加した場合には、リーリン複合体は正常に形成された。従ってCR-50抗体は、20  $\mu$ g/mlにおいても明らかにリーリン分子同士の結合を阻害する。CR-50抗体はほぼこの濃度からリーリンに対する機能阻止効果を示すため（Ogawa, M.ら, (1995) *Neuron*, 14, 899-912;）、分子間相互作用に対する阻害効果はリーリン機能阻止活性と良く相関する。これらの結果から、CR-50エピトープ領域がリーリントタンパク質の会合体形成において重要な領域であり、リーリン複合体の形成が生理的機能において重要な役割を有していると考えられる。

#### 【0040】

##### 〔実施例4〕

##### ゲル濾過クロマトグラフィー

CR-50エピトープの構造的及び物理的特徴を調べるために、分析用ゲル濾過クロマトグラフィーによってCR-50エピトープ断片を分析し、エピトープが集まってホモポリマーを形成できるか否かを調べた（図5）。

#### 【0041】

クロマトグラフィーは、FPLCゲル濾過クロマトグラフィーシステム（Pharmacia）を使用した。このシステムはコンピューターFPLC指令プログラム（Pharmacia）によって制御されている。サンプルを、20mMリン酸ナトリウム、pH7.4、0.15M NaCl、5mM DTTを含有するバッファーで予め平衡化したSuperdex-200ゲル濾過カラム（分離範囲：10-600kDa、Pharmacia）上にのせ、流速0.5ml／分で溶出させた。ロードしたサンプル濃度は40  $\mu$ Mに調製した。

#### 【0042】

生理的条件下（0.15M NaCl、pH7.4）で、CR-50エピトープ断片の溶出プロファイルはこのカラムの空隙容量（ $V_0$ ）にポリマーのピークを示すのみであった（図5A）。このことから、全ての断片が600kDaより大きい分子量の巨大な複合

体に会合していることが示唆される。CR-50エピトープモノマーの分子量は約15kDaであり、従ってこのポリマーは40個以上のCR-50エピトープ分子から構成されている。このポリマーは10mMのジチオスレイトール（DTT）の存在下においても検出された。

【0043】

〔実施例5〕

#### 電子顕微鏡測定

電子顕微鏡を用い、CR-50エピトープポリマーの構造を調べた。CR-50エピトープポリマーの全体像は、ロータリーシャドウイング法及びネガティブ染色法（Katayama, E., (1989) J. Biochem., 106, 751-70）を用いて観察した。CR-50エピトープタンパク質の溶液をカーボン被覆銅グリッド上にアプライした。ロータリーシャドウイング法では、次にグリッドをプラチナでロータリーシャドウした。ネガティブ染色法の場合、グリッドを1%酢酸ウラニルでネガティブ染色し、洗浄及び風乾した。これらのサンプルを、加速電圧80kVで操作するJEOL 2000EX透過型電子顕微鏡（日本電子）で調べた。電子顕微鏡測定のためのサンプル濃度は0.2  $\mu$ Mに調製した。

【0044】

電子顕微鏡写真から、10mMのDTT存在にも関わらず、長さ100-400nmの多数の数珠状ポリマー構造が明らかになった（図6D-F）。図6Dに示すポリマーは、より微細なポリマーがねじれた構造を有しているように見える。実際には、直線状の構造を有するいくらか（全体の3%未満）のより微細なポリマーも観察された（図6E）。

【0045】

〔実施例6〕

#### コンゴー赤測定

CR-50エピトープ溶液は、不溶性沈殿がなく、透明であり、大腸菌によって産生した組み換えタンパク質を使用した場合に見られることのある不規則な凝集は観測されない。上記のポリマーが不規則な凝集物と異なることを更に確かめるために、サンプルを顕微鏡バンドシフトアッセイによってコンゴー赤結合について

試験した (Klunk, W. E.ら, (1989) J. Histochem. Cytochem., 37, 1273-1279; Klunk, W. E.ら, (1989) J. Histochem. Cytochem., 37, 1293-1297; Klunk, W. E.ら, (1999) Anal. Biochem., 266, 66-76)。コンゴー赤は、規則的な平行的配置にある $\beta$ -シート構造を有するアミロイド様原線維に結合することが知られており、これはコンゴー赤の吸収スペクトルにおける赤色シフトによって検出することができる (Klunk, W. E.ら, (1999) Anal. Biochem., 266, 66-76)。コンゴー赤分析は先に報告されているように (Klunk, W. E.ら, (1989) J. Histochem. Cytochem., 37, 1273-1279; Klunk, W. E.ら, (1989) J. Histochem. Cytochem., 37, 1293-1297; Klunk, W. E.ら, (1999) Anal. Biochem., 266, 66-76) 実施した。20mMリン酸ナトリウム及び0.15M NaClを含有する10 $\mu$ Mコンゴー赤バッファー (pH7.4) 500 $\mu$ lにタンパク質を添加した。反応サンプルは完全に混合し、Jusco660分光光度計によって吸収スペクトルを記録する前に少なくとも30分間室温でインキュベートした。

## 【 0 0 4 6 】

コンゴー赤溶液にCR-50エピトープポリマーを添加すると、 $\lambda_{\max}$ は486nm (対照: 図6A(b)に示す) から505nm (図6A(a)) となり、赤色シフトが誘導されたが、不規則な凝集物ではこのシフトは生じない。ポリマー含有溶液と色素のみの溶液とでスペクトルが最も異なる点は528nmであり (図6B)、アミロイド原線維の場合 (541nm; Klunk, W. E.ら, (1999) Anal. Biochem., 266, 66-76) よりも短波長側であった。従って、CR-50エピトープ断片は規則的な構造を有する数珠状可溶性ポリマーを形成するが、これはアミロイド原線維の構造と異なっていた。

## 【 0 0 4 7 】

## 【実施例7】

円偏光二色性 (CD) 顕微鏡測定

CR-50エピトープ断片の二次構造を分析するために、円偏光二色性 (CD) 分光測定を実施した。CDスペクトルは、温度を20℃に制御するためのコンピューター制御された水浴を備えたJasco分光偏光計、モデルJ-725で測定した。結果は平均残基楕円率  $[\theta]$  として表した。CDスペクトルはタンパク質濃度5 $\mu$ Mで測定し

た。分光偏光計は窒素ガスで満たし、195 nm から 250 nm まで走査した。各スペクトルを得るために10回の測定蓄積から平均化した。二次構造含量はellipticity値から評価した (Greenfield, N. J. & Fasman, G. D., (1969) *Biochemistry*, 8, 4108-4116; Chen, Y. -H.ら, (1972) *Biochemistry*, 11, 4120-4131; Brahms, S. & Brahms, J., (1980) *J. Mol. Biol.*, 138, 149-178; Greenfield, N. J. (1996) *Anal. Biochem.* 235, 1-10)。

## 【 0 0 4 8 】

生理的条件下 (0.15M NaCl、pH7.4) で、CR-50エピトープ断片のCDスペクトルは、207 nm に最小を有するブロードな負の曲線を示した (図 6 C における 0.15 M)。この結果から、CR-50エピトープ断片における  $\alpha$ -ヘリックス及び  $\beta$ -シートの相対比率は、それぞれ約 20% 及び 40% であると算定された (Greenfield, N. J. & Fasman, G. D., (1969) *Biochemistry*, 8, 4108-4116; Chen, Y. -H.ら, (1972) *Biochemistry*, 11, 4120-4131; Brahms, S. & Brahms, J., (1980) *J. Mol. Biol.*, 138, 149-178)。

## 【 0 0 4 9 】

## 〔実施例 8〕

ポリマー形成に対するイオン強度の影響

ポリマー形成のメカニズムを調べるために、ポリマー形成に対するイオン強度の影響を検討した。塩 (NaCl) 濃度を上昇させるにつれて、ポリマーは次第にモノマーに解離し、このポリマーが静電的相互作用によって形成されていることが示された (図 5 A-D)。最終的に、1.0M の NaCl において、全ての断片がモノマーとして存在した (図 5 D)。ポリマーからモノマーへのこの転移は、塩濃度に依存して可逆的であった。CD スペクトル分析から、塩濃度が上昇した場合には負の極小値が長波長側にシフトし、楕円率が減少することが示された (図 6 C)。これらの結果は、 $\beta$ -シート含量が増加し、 $\alpha$ -ヘリックス含量が減少することを意味する。1.0M の NaCl において、ポリマーが完全にモノマーに解離した場合 (図 5 D)、負の極小は 218 nm になり、ほとんど全ての規則的構造が  $\beta$ -シートであることが示される (図 6 C)。これらの結果から、 $\alpha$ -ヘリックス領域が主としてポリマー形成に寄与していることが示唆される。

## 【 0 0 5 0 】

## 【発明の効果】

本明細書に記載したデータから、*in vitro*及び*in vivo*において、リーリン分子が互いに集まって巨大なタンパク質複合体を形成していることが示される。本研究（図2A）及び先に報告したように（Ogawa, M.ら, (1995) *Neuron*, 14, 899-912; deBerbeyck, V.ら, (1997) *Mol. Brain Res.*, 50, 85-90; Miyata, T.ら, (1997) *J. Neurosci.*, 17, 3599-3609; Nakajima, K.ら, (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 8196-8201）、分泌されたリーリンのいくつかは、未知のメカニズムによってリーリン産生細胞の表面に結合している。生細胞上のリーリンタンパク質を抗体で免疫染色すると、細胞膜上に多くの斑点として標識され、これはリーリン会合体のマトリクスを反映している可能性がある。更に、培養細胞から分泌されたリーリンタンパク質が培地中において複合体を形成していることも示された。従って、リーリンは細胞表面に結合しているか、細胞外に分泌されているかに関わらず、会合していると考えられる。リーリン受容体発現細胞が移動してリーリンと相互作用する場合、リーリン複合体は「多価リガンド」として機能し、受容体の多量体化を誘導し、タンパク質キナーゼによる細胞内Dab1タンパク質のリン酸化を引き起こすかもしれない。この受容体の多量化は、胎児の脳を抗CNRタンパク質及びCR-50抗体で二重染色した場合、リーリンと共に位置する「斑点」として観察されている可能性がある（Senzaki, K.ら, (1999) *Cell*, 99, 635-647）。

## 【 0 0 5 1 】

リーリンタンパク質の会合体形成は、リーリンのN末端近くに位置するCR-50エピトープ領域を介して静電的相互作用によって起こると考えられる。CR-50抗体は固定及びエタノール処理等の種々の処理に対して非常に感受性が高いことから三次元構造を認識していると考えられる。このエピトープ領域はリーリン機能に必須であり、CR-50抗体は皮質の再凝集培養実験における層構造形成（Ogawa, M.ら, (1995) *Neuron*, 14, 899-912）、小脳移植片培養におけるプルキンエ細胞の配列（Miyata, T.ら, (1997) *J. Neurosci.*, 17, 3599-3609）、及び*in vitro*での内側嗅領－海馬経路における軸索分岐パターン（DelRio, J. Q.ら, (1997)



Nature, 385, 70-74) を阻害し、in vivoで海馬の発達を阻止する (Nakajima, K. ら, (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 8196-8201)。

# 【 0 0 5 2 】

本明細書に記載の結果から、分泌されたリーリンの会合体形成は、CR-50抗体によって、20  $\mu$ g/mlにおいても阻害されることが示される。リーリン機能はほぼこの濃度からCR-50抗体によって阻害されるため、その機能が阻止されたときにリーリンの会合体形成も阻害されると考えられる。近年、リポタンパク質受容体 (VLDLR及びApoER2) 及びCNRファミリーメンバーが全長リーリンに結合することが報告された (D' Arcangeloら, (1999) Neuron 24, 471-479; Hiesberger, T.ら, (1999) Neuron, 24, 481-489; Senzaki, K.ら, (1999) Cell, 99, 635-647)。しかしながら、VLDLR及びApoER2は、CR-50エピトープ領域を含むリーリンの組み換えN末端部には結合せず、CNRタンパク質は、CR-50エピトープ領域の下流にある第1のリーリンリピートのサブリピートBに結合する (Senzaki, K.ら, (1999) Cell, 99, 635-647)。これらの結果から、これら3種全ての結合部位は、リーリン上のCR-50エピトープ領域の外側に位置することが示される。しかしながら、更なる分析から、CR-50抗体が、VLDLR発現293T細胞 (D' Arcangeloら, (1999) Neuron 24, 471-479) 及びCNR1タンパク質の細胞外ドメイン (Senzaki, K.ら, (1999) Cell, 99, 635-647) へのリーリンの結合を阻害することが明らかになった。これらの結果の解釈は、N末端へのCR-50結合によって、リーリン上の結合部位に構造変化または立体障害が誘導され、受容体-リーリン相互作用が間接的に阻害される可能性である。あるいはまた、またはその上、リガンド (リーリン) そのものの巨大な複合体形成を妨害することによって、CR-50抗体が受容体に結合したリーリンタンパク質の数を減少させる可能性もある。リーリンの会合体形成はCR-50抗体によって阻害されるため、各受容体はリーリンの巨大な複合体よりもモノマーに結合している可能性があり、受容体-リガンド相互作用の直接阻害と区別することは困難である。興味深いことに、小脳顆粒細胞から分泌されるリーリンの会合は20  $\mu$ g/mlの抗体によってさえ阻害された (図3F)。対照的に、リポタンパク質受容体発現細胞へのリーリンの結合は、115及び300  $\mu$ g/mlのCR-50抗体によってそれぞれ36%及び16%まで減少した (D' Arcangeloら, (1

999) Neuron 24, 471-479)。本明細書に記載した全長リーリンを用いた細胞接着アッセイは、この抗体による実質的に同程度の阻害を示した（図3E：50及び200  $\mu$ g/mlのCR-50抗体で44%及び32%まで減少）。培養細胞を用いた細胞接着アッセイでは一般にバックグラウンドが高いことを考慮すると（図2D-G、4B、C）、これらのデータから、CR-50抗体が、リーリンタンパク質そのものの会合体形成を阻害することによって、（少なくとも一部は）リーリン機能を中和している可能性が示唆される。従って、受容体に対するリーリンモノマーの結合がニューロン移動を制御する適切なシグナル伝達を開始することができるか否かを明らかにすることが重要である。

## 【0053】

精製したCR-50エピトープ断片は速やかに会合して規則的な反復構造を有する可溶性のホモポリマーを形成する。このポリマーは $\alpha$ -ヘリックス+ $\beta$ -シート構造を有し、この内 $\alpha$ -ヘリックス領域が主としてポリマー形成に寄与している。Chou & Fasman法（Chou, P. Y. & Fasman, G. D. (1978) Adv. Enzymol., 47, 45-148）による二次構造予測から、エピトープがC末端に長い $\alpha$ -ヘリックスドメインを有し、中央部に短い $\alpha$ -ヘリックスドメインを有することが示唆された。実際、これらの部位は多くの（約30%）荷電したアミノ酸を含み、これがポリマー形成に関係していると考えられる。これら2つのドメインはヒンジとして機能してモノマーを会合させ、数珠状のひも様構造のポリマーを形成する可能性がある。pH変化による実験から、CR-50エピトープ断片が生理的条件下においてのみ元の $\alpha$ -ヘリックス+ $\beta$ -シート構造をとることが示された（データは示さない）。本発明者等はまた、CR-50エピトープ断片間の静電的相互作用がCR-50エピトープの表面電荷密度に依存することを見出した。

## 【0054】

ゲル濾過分析における興味深い知見は、生理的条件下においては巨大なポリマーのピークのみがあり、モノマーのピークがないことであった（図5A）。しかしながら、全長リーリンのウエスタンブロットから、モノマーからネイティブなゲルの上端まで広がるブロードなバンドが示され（図1B-D）、構成モノマー数の異なる種々のポリマーがあることが示される。CR-50エピトープ領域そのもの

は速やかに会合し、次いでそれが全長ポリマー形成の駆動力となることが示唆される。全長分子の場合、立体障害または他の何らかのメカニズムによって、種々の重合段階に留められるのであろう。

## 【 0 0 5 5 】

本発明によって、脊椎動物の発達中の脳におけるリーリントパク質の会合体形成が、この相互作用を明らかに阻害する機能阻害抗体、CR-50に対するエピトープ領域によって仲介されることが初めて明らかになった。生体において、リーリンが大きな複合体として機能し、神経発達過程におけるニューロンの移動を制御していることが示唆されるが、この複合体形成の状態を本発明のポリペプチドを用いて検討することが可能である。

## 【 0 0 5 6 】

更に、本発明は、上記のような生体内におけるリーリントパク質の機能の解明と共に、本発明のポリペプチドまたはこれをコードするポリヌクレオチドを用いて、リーリントパク質の会合を促進し、リーリン遺伝子の異常並びにニューロンの配置異常に起因する脳の障害及び疾患、例えば滑脳症、多小脳回症、異所性灰白質等の疾患の適切な診断及び治療に利用することができる。

本発明のポリペプチドは、F-spondinドメイン及びリピート部位を含まないので、分子が小さく、必要とする複合体形成の目的のためにのみ使用することができ、添加効果が大いことが特徴であり、特に以下のような利点を有する。

## 【 0 0 5 7 】

まず、疾患の治療の目的のため、患者である個体に投与する場合、その投与方法に関わらず、本来その個体に欠損している物質を体外から人工的に投与するので、その個体に外来物質が導入されることになる。この外来物質の投与は、目的とする主作用のみならず、副作用をも引き起こすことが考えられる。治療に有効な、必要不可欠の最小限のポリペプチドとしてエピトープ領域を特定できたことにより、エピトープ領域のみのポリヌクレオチド、あるいはポリペプチドという形で投与する場合、本来治療に不必要な部分を含まないので、外来物質誘導性の副作用を最小限に抑制することができる。

また、治療に必要な最小限の領域であるエピトープ領域だけに限定すれば、そ

れをコードするポリヌクレオチド及びポリペプチドそのものを作製するコストを  
最小限に抑えることができる。

【 0 0 5 8 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<120> Reelin protein CR-50 epitope region

<130> RJH12-008N

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 351

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

gag cag tgt ggc acc atc atg cat ggc aat gct gtc acc ttc tgt gag 48

Glu Gln Cys Gly Thr Ile Met His Gly Asn Ala Val Thr Phe Cys Glu

1

5

10

15

ccg tac ggc cct cga gag ctg acc acc aca tgc ctg aac aca aca aca 96

Pro Tyr Gly Pro Arg Glu Leu Thr Thr Thr Cys Leu Asn Thr Thr Thr

20

25

30

gca tct gtc ctc cag ttt tcc att ggg tca gga tca tgt cga ttt agt 144

Ala Ser Val Leu Gln Phe Ser Ile Gly Ser Gly Ser Cys Arg Phe Ser

35

40

45

tac tct gac ccc agc atc act gtg tca tac gcc aag aac aat acc gct 192

Tyr Ser Asp Pro Ser Ile Thr Val Ser Tyr Ala Lys Asn Asn Thr Ala

50

55

60

gat tgg att cag ctg gag aaa att aga gcc cct tcc aat gtg agc aca 240

Asp Trp Ile Gln Leu Glu Lys Ile Arg Ala Pro Ser Asn Val Ser Thr

65

70

75

80

gtc atc cac atc ctg tac ctc ccc gag gaa gcc aaa ggg gag agc gtg 288

Val Ile His Ile Leu Tyr Leu Pro Glu Glu Ala Lys Gly Glu Ser Val

85

90

95

cag ttc cag tgg aaa cag gac agc ctg cga gtg ggt gag gtg tat gag 336

Gln Phe Gln Trp Lys Gln Asp Ser Leu Arg Val Gly Glu Val Tyr Glu

100

105

110

gcc tgc tgg gcc ctg 351

Ala Cys Trp Ala Leu

115

<210> 2

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Glu Gln Cys Gly Thr Ile Met His Gly Asn Ala Val Thr Phe Cys Glu

1 5 10 15

Pro Tyr Gly Pro Arg Glu Leu Thr Thr Thr Cys Leu Asn Thr Thr Thr

20 25 30

Ala Ser Val Leu Gln Phe Ser Ile Gly Ser Gly Ser Cys Arg Phe Ser

35 40 45

Tyr Ser Asp Pro Ser Ile Thr Val Ser Tyr Ala Lys Asn Asn Thr Ala

50 55 60

Asp Trp Ile Gln Leu Glu Lys Ile Arg Ala Pro Ser Asn Val Ser Thr

65 70 75 80

Val Ile His Ile Leu Tyr Leu Pro Glu Glu Ala Lys Gly Glu Ser Val

85 90 95

Gln Phe Gln Trp Lys Gln Asp Ser Leu Arg Val Gly Glu Val Tyr Glu

100 105 110

Ala Cys Trp Ala Leu

115

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic primer for PCR

<400> 3

atggagcgcg gctgctgggc

20

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic primer for PCR

<400> 4

aggaacaaca ggaacacag

19

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic primer for PCR

<400> 5

cctctctcca tctttgagga ac

22

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic primer for PCR

<400> 6

cagggcccag caggcctcat ac

22

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic primer for PCR

<400> 7

ctctcccatc tcacagttgc tg

22

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>



<223> synthetic primer for PCR

<400> 8

gtaagcagtg gcctctgtgg g

21

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic primer for PCR

<400> 9

tactcgacc ttgctgaaat ac

22

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic primer for PCR

<400> 10

gagcagtgtg gcaccatcat g

21

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic primer for PCR

<400> 11

gagcagtgtg gcaccatc

18

【 0 0 5 9 】

【配列表フリーテキスト】

配列番号 3 : PCRのための合成プライマー

配列番号 4 : PCRのための合成プライマー

配列番号 5 : PCRのための合成プライマー

配列番号 6 : PCRのための合成プライマー

配列番号 7 : PCRのための合成プライマー

配列番号 8 : PCRのための合成プライマー

配列番号 9 : PCRのための合成プライマー

配列番号 1 0 : PCRのための合成プライマー

配列番号 1 1 : PCRのための合成プライマー

【図面の簡単な説明】

【図 1】

天然のリーリン分子が共に会合していることを示す。

(A) リーリンの一次構造の模式図を示す。CR-50抗体はリーリンリピートの上流を認識する。

(B-D) 抗リーリン抗体による免疫ブロットを示す。(B) リーラーヘテロ接合体 (r1/+ ) 及びホモ接合体 (r1/r1) 大脳 (E18) のホモジネートでSDS-PAGEを実施した。(C) リーラーヘテロ接合体及びホモ接合体の大脳 (E18) 及び小脳 (P5) のホモジネートをネイティブPAGEによって分離した。(D) リーラーヘテロ接合体及びホモ接合体 (P5) の小脳初代培養の上清をネイティブPAGEゲル上

にのせた。

### 【図 2】

細胞接着アッセイから、リーリン分子が互いに結合することが示される。(A、B) リーリンをトランスフェクトした293T細胞のCR-50抗体による免疫染色を示す。CR-50を生細胞に添加した場合、細胞表面上に斑点状の染色が観察され(A)、一方固定及び膜を透過性にした後にCR-50を添加した場合、細胞質が全体的に染色された(B)。(C-F) 細胞接着アッセイを示す。(C) リーリン被覆皿上のリーリン提示細胞。(D) 対照被覆皿上のリーリン提示細胞。(E) リーリン被覆皿上の対照細胞。(F) 対照被覆皿上の対照細胞。(G) (F) を100とスコアして標準化させた細胞数を示すヒストグラムを示す。数値は5回の独立した実験の平均値±標準偏差(S.D.)である。

### 【図 3】

CR-50抗体によるリーリン分子間の相互作用の阻害を示す。

(A-E) CR-50抗体による細胞接着の阻害を示す。(A) リーリン被覆皿上のリーリン提示細胞。(B-D) 20、50及び200  $\mu\text{g/ml}$ のCR-50抗体と共にそれぞれインキュベーションした後のリーリン被覆皿上のリーリン提示細胞。(E) (A) に標準化した(A-D)それぞれの細胞数を示すヒストグラム。数値は5回の独立した実験の平均値±標準偏差(S.D.)である。(F) CR-50抗体によるリーリン会合の阻害を示す。リーラーヘテロ接合体小脳(P5)細胞をマウスIgGなし(-)、非免疫化マウスIgG、またはCR-50抗体の存在下培養した。これらの培養の上清をネイティブPAGEで分離し、抗リーリンで検出した。

### 【図 4】

リーリンは細胞接着アッセイにおいてCR-50エピトープ領域に結合する。(A) CR-50エピトープ被覆皿(200  $\mu\text{g/ml}$ )上のリーリン提示細胞。(B) 対照被覆皿上のリーリン提示細胞。(C) 対照に標準化したCR-50エピトープ被覆皿(200または50  $\mu\text{g/ml}$ )上の接着アッセイにおける細胞数を示すヒストグラム。

### 【図 5】

CR-50エピトープ断片のホモポリマー形成を示す。(A) CR-50エピトープ断片が0.15M NaClにおいて600kDa以上の分子量を有するホモポリマーを形成するこ

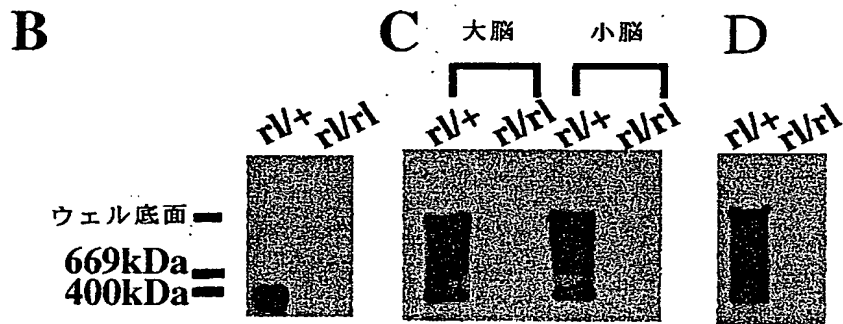
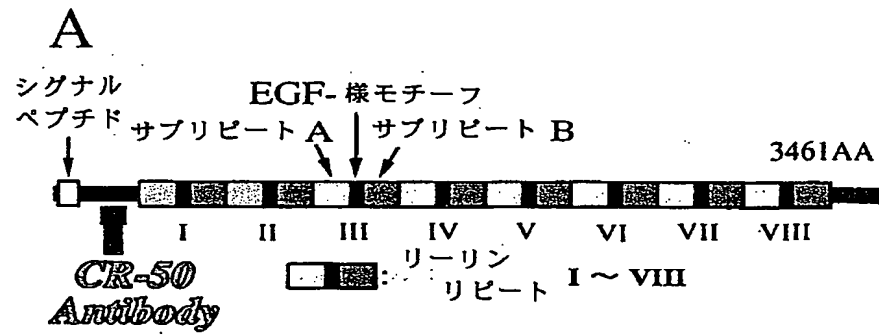
とを示すゲル濾過クロマトグラフィーの溶出プロファイル。(B) - (D) ポリマーが高イオン強度において解離することを示す(B : 0.5M NaCl ; C : 0.75M NaCl ; D : 1.0M NaCl)。ポリマーのピークは溶出時間7.7分があり、モノマーのピークは15.2分にある。 $V_0$ はカラムの空隙容量を示す。

【図 6】

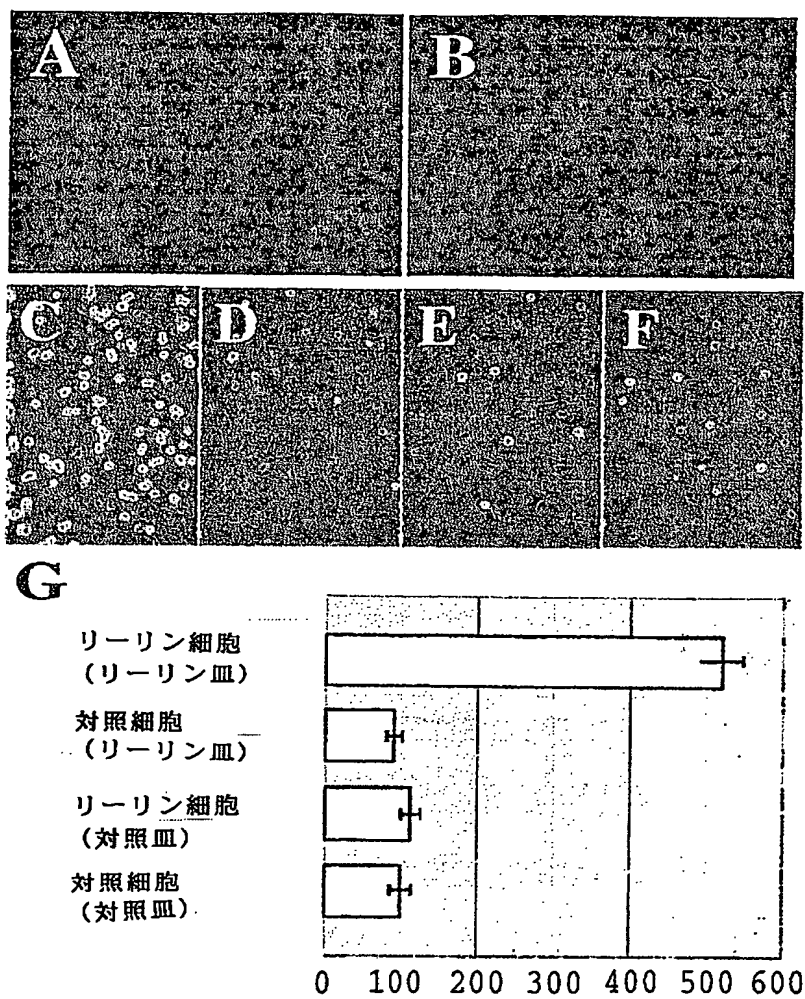
CR-50エピトープポリマーの構造解析を示す図である。(A) (a) コンゴ赤及びCR-50エピトープポリマー、及び(b) コンゴ赤単独での吸収スペクトルを観察した。CR-50エピトープポリマーを添加した場合に $\lambda_{\max}$ の赤色シフトが生じる。(B) CR-50エピトープポリマーを含有する色素溶液及び色素のみの溶液間のスペクトルの差異を検出した。(C) 種々のNaCl濃度におけるCR-50エピトープ断片のCDスペクトルを観察した。(D-F) ロータリーシャドウイング法(D、E) 及びネガティブ染色法(F) によるCR-50エピトープポリマーの電子顕微鏡写真(棒=100nm)。

【書類名】 図面

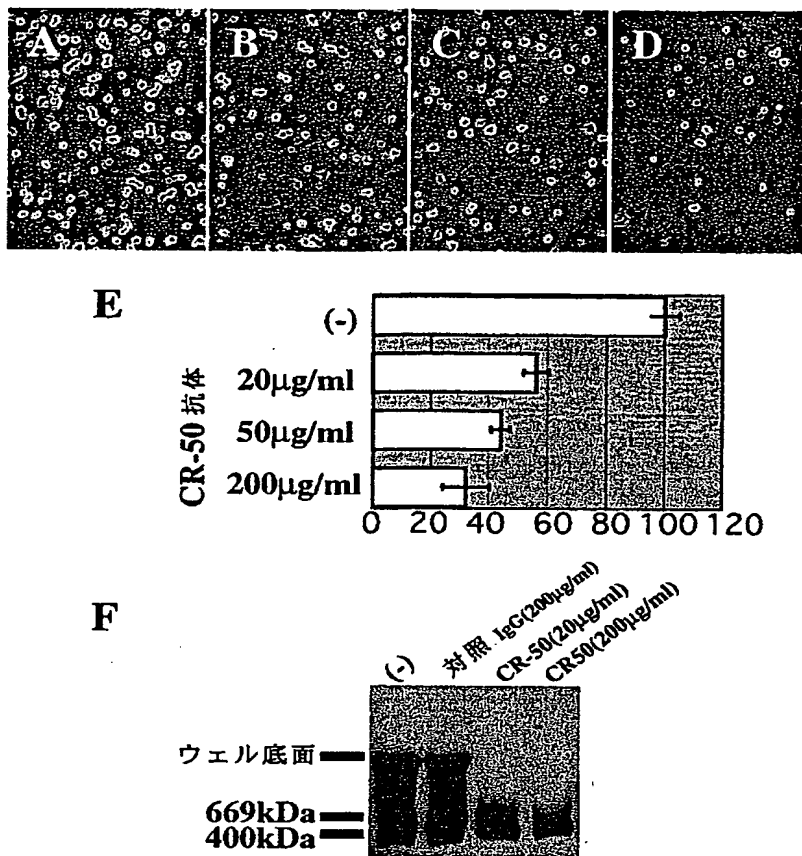
【図 1】



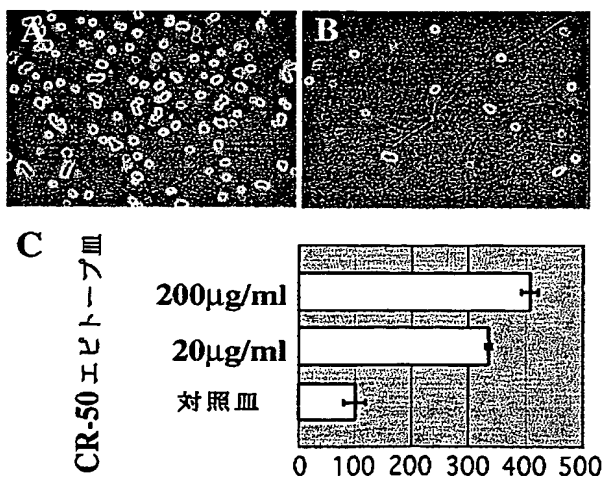
【図 2】



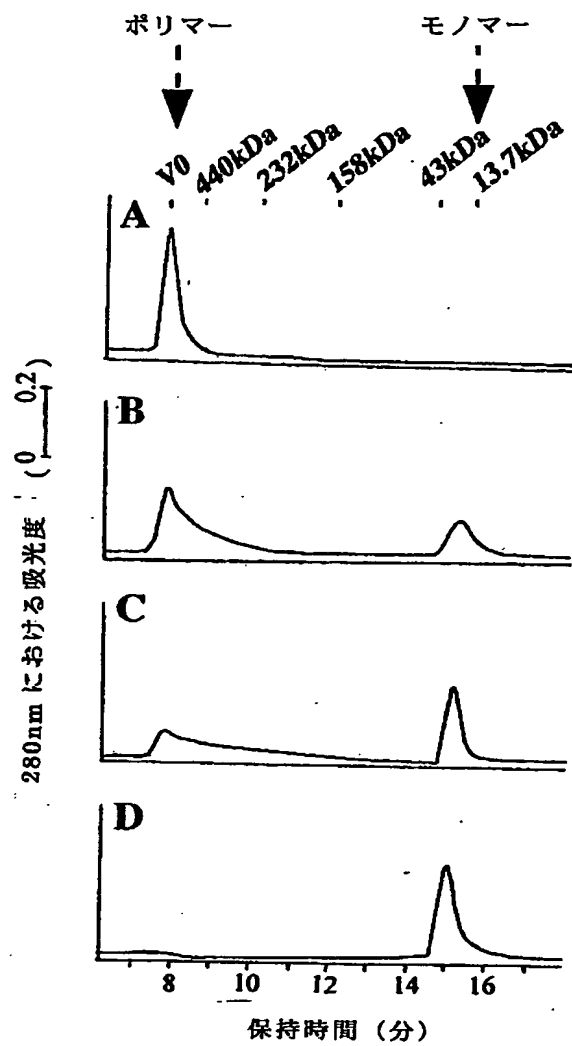
【図 3】



【図 4】

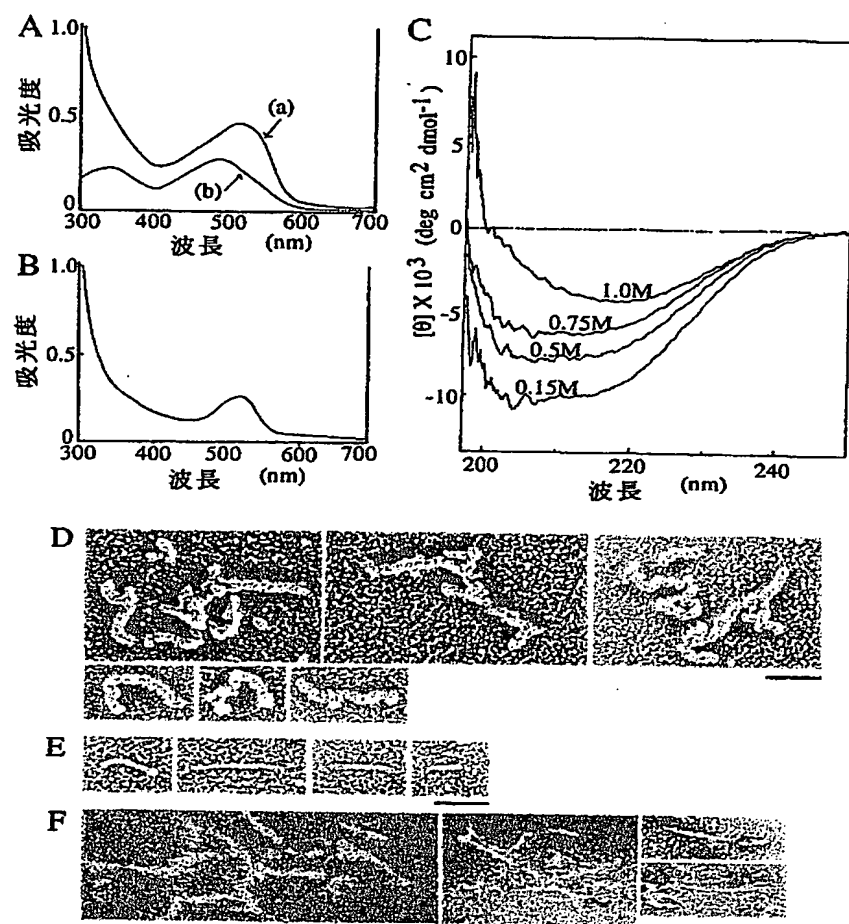


【図 5】





【図 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 脊椎動物におけるリーリントタンパク質自体の機能を更に研究し、リーリン遺伝子の異常並びにニューロンの配置異常に起因する脳の障害に対して適切な診断及び治療を提供することを可能とする。

【解決手段】 リーリントタンパク質のCR-50抗体認識部位を含み、F-spondinドメイン及びリピート部位を含まないリーリントタンパク質エピトープ領域ポリペプチド及びこれをコードするポリヌクレオチドを提供する。

【選択図】 図4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006792]

1. 変更年月日	1990年 8月28日
[変更理由]	新規登録
住 所	埼玉県和光市広沢2番1号
氏 名	理化学研究所